Experimentelle autoradiographische Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von Dickdarmpolypen bei Ratten

Ursula Krey

1972

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Direktor : Prof. Dr.med. M. Eder

Experimentelle autoradiographische Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von Dickdarmpolypen bei Ratten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ursula Krey

aus Göttingen

1971

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Wiebecke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Eder
Dekan:	Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	21.3.1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung und Problemstellung	1
Material und Methodik	
1. Tiermaterial	4
2. Behandlung	5
3. Untersuchungsgang	7
Ergebnisse	15
Diskussion der Ergebnisse	39
Zusammenfassung	48
Literaturverzeichnis	50

Einleitung und Problemstellung

Die Frage nach der Dignität der Dickdarmpolypen und ihrer Stellung innerhalb einer carcinogenetischen Entwicklungsreihe ist bis heute noch nicht befriedigend geklärt. Diese Unsicherheit in der Beurteilung der Polypen stellt insbesondere den Chirurgen oft vor schwierige Entscheidungen.

In der Vergangenheit wurde deshalb vor allem mit statistischen Methoden versucht, das Problem anzugehen. Insbesondere bei der Polyposis und bei multiplen Polypen ergaben sich positive Beziehungen zur Carcinomentwicklung. Diese Untersuchungsmethode ist jedoch weitgehend ungeeignet, wenn es um die Abschätzung der Dignität einzelner Polypen geht.

Es liegt daher nahe, nach den pathogenetischen Prinzipien zu fragen, die der Polypenentwicklung zugrunde liegen und damit die Beziehungen und auch die Grenzen gegenüber dem Carcinom aufzuzeigen. Die Untersuchung der Proliferations-

kinetik der Polypen stellt hierbei einen brauchbaren Ansatzpunkt dar. In jüngster Vergangenheit sind bereits vereinzelt proliferationskinetische Untersuchungen mit radioaktiven Substanzen an menschlichen Polypen in vivo vorgenommen worden (Cole, McKalen (3), Deschner, Lewis, Lipkin (6)). Hierbei ergab sich eine Verlagerung der Proliferationszone in die oberen Schleimhautschichten der adenomatösen Polypen.

Den Ergebnissen konnte zwar keine Allgemeingültigkeit beigemessen werden, da es sich bei den untersuchten Fällen jeweils um den Sonderfall einer hereditären Polyposis intestini handelte, doch wurden die Ergebnisse später im eigenen Untersuchungskreis an solitären menschlichen Dickdarmpolypen bestätigt und quantitativ gesichert (Brandts (1)).

Die Untersuchung der pathogenetischen Prinzipien der Polypenentwicklung im Tierexperiment scheiterte in der Vergangenheit daran, daß ein geeignetes

experimentelles Modell nicht zur Verfügung stand. In den letzten Jahren wurde jedoch eine Reihe darmwirksamer Carcinogene entdeckt (Laqueur et al. (13), Laqueur (11,12), Spjut u. Spratt (21), Druckrey et al. (7), Schoental u. Bensted (19)), wodurch die systematische Erzeugung von Darmtumoren im Tierexperiment möglich geworden ist. Unter den Darmcarcinogenen zeigte besonders das 1,2-Dimethylhydrazin eine ausgeprägte Organotropie und führte bei ausreichender Dosierung zuverlässig zu Darmpolypen und -carcinomen sowohl bei Ratten (Druckrey et al. (8)) als auch bei Mäusen (Wiebecke et al. (23)).

Der Vorteil der Reproduzierbarkeit der Tumoren und die Möglichkeit, alle Entwicklungsstadien zu erfassen, war der Grund, dieses experimentelle Modell für die vorliegenden Untersuchungen zu verwenden.

Dabei wurde das Ziel verfolgt, durch autoradio-

graphische Markierung der DNS-synthetisierenden Zellen die Veränderungen in den epithelialen Proliferationszonen während der Polypenentwicklung quantitativ zu erfassen.
Es sollte festgestellt werden, ob ähnliche Veränderungen der Proliferationskinetik vorliegen wie bei menschlichen Dickdarmpolypen, somit ein allgemeines pathogenetisches Prinzip ableitbar ist, und ob hieraus Schlüsse bezüglich der Dignität der Darmpolypen gezogen werden können.

Material und Methodik

1. Tiermaterial

Die Untersuchungen sind Teil einer größeren Versuchsreihe, zu der 55 weibliche NMRI-Mäuse mit dem Ausgangsgewicht von 25 - 30 g, 26 BD-Ratten und 42 Wistar-Ratten mit dem Ausgangsgewicht von 150 - 200 g verwendet wurden. Die Tiere erhielten standardisiertes Preßfutter

sowie Wasser nach Bedarf.

2. Behandlung

Aus 1,2-Dimethylhydrazin-dihydrochlorid wurde nach Angaben von Druckrey u. Mitarb. (9) mit steriler physiologischer Kochsalzlösung eine 0,35%ige Lösung hergestellt (bezogen auf die Base), die mit 0,1%iger Natronlauge auf einen pH von 6,5 eingestellt wurde. Außerdem wurden 1,5 mg% EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) zugesetzt. Die Lösung wurde vor den Injektionen jeweils frisch angesetzt.

Alle Tiere erhielten wöchentlich eine subcutane Injektion von Dimethylhydrazin (DMH), jedoch entsprechend der jeweiligen Versuchsgruppe in unterschiedlicher Dosierung :

15 Mäuse erhielten 7 mg/kg/Woche, 40 Mäuse erhielten 14 mg/kg/Woche, 26 BD-Ratten 7 mg/kg/Woche, 20 Wistar-Ratten 14 mg/kg/Woche und 22 Wistar-Ratten erhielten 21 mg/kg/Woche.

Die Tiere wurden vom 2. Behandlungsmonat an zur

Erfassung der Frühveränderungen an der Darmschleimhaut zeitlich gestaffelt getötet, spätestens jedoch dann, wenn Allgemeinsymptome wie Gewichtsverlust, Durchfall usw. das Vorhandensein von Darmtumoren vermuten ließen. Jeweils 40 Minuten vor der Tötung durch cervicale Dislokation erhielten die Tiere ^{3}H-Thymidin (spez. Aktivität 2,0 µC/mMol, NEN Chemicals, Boston, USA) in einer Dosierung von 2 µC/g Körpergewicht intraperitoneal.

Der Darm wurde am Mesenterium abgesetzt, auf mit Meßeinheiten bezeichnete Pappe gelegt, und der Länge nach aufgeschnitten. Von allen Tieren wurden regelmäßig 3 cm lange Darmstücke aus dem Colon ascendens, dem Colon descendens und z.T. dem Rectum entnommen, zusätzlich alle Darmabschnitte mit makroskopisch sichtbaren Veränderungen. Die Präparate wurden in 6%igem neutralen Formol 24 Stunden lang fixiert und nach 24-stündigem Wässern und Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe über Methylbenzoat und Benzol in

Paraffin bzw. Paraplast eingebettet. Aus allen Präparaten wurden 4 µ dicke Stufenschnitte senkrecht zur Muscularis mucosae angefertigt, im Zentrum der jeweiligen Veränderung jedoch Serienschnitte. Nach Entparaffinieren und Waschen in einer Lösung von inaktivem Thymidin (0,1 mg/ml) wurden die Schnitte mit flüssiger Photoemulsion (Ilford K 2 oder G 5)überschichtet und in der Dunkelkammer 6 - 21 Tage exponiert. Nach photographischer Entwicklung erfolgte die Färbung der Präparate mit Hämalaun durch die Emulsions- bzw. Filmschicht hindurch.

3. Untersuchungsgang

Die gefundenen Veränderungen wurden nach histologischen Merkmalen in folgende Gruppen eingeteilt :

a. Schleimhauthyperplasien :

makroskopisch gekennzeichnet durch verdickte und verbreiterte Schleimhautfalten, mikroskopisch durch mehr oder weniger deutlich

verdickte Schleimhaut, Verlängerung der Krypten bei erhaltener Differenzierung von Becher- und Saumzellen.

b. Adenomatöse Polypen :

Sie sind makroskopisch in breitbasige und gestielte Polypen zu unterteilen. Mikroskopisch sind sie gekennzeichnet durch eine mehr oder weniger verbreiterte Schleimhaut, stärkere Basophilie des Epithels bei geringer Differenzierung, stärkere Schlängelung und adenomähnliche Wucherung, Erweiterung und Ausbuchtung der Drüsenschläuche mit dicht gelagerten oft mehrreihig angeordneten Epithelkernen und einer deutlichen Verminderung der Becherzellen. Wegen der geringeren Ausdifferenzierung des Oberflächenepithels sind adenomatöse Polypen häufig erodiert.

c. Villöse Polypen :

meist breitbasig; mikroskopisch starke Verlängerung der Drüsenschläuche mit Ausbildung

von Schleimhautzotten, die wie beim adenomatösen Polypen von einem gering differenzierten, stärker basophilen und oft mehrreihigen Epithel bekleidet werden.

Zur quantitativen Auswertung wurden nur eindeutig nach den angeführten Gesichtspunkten klassifizierbare Polypen verwendet. Alle Übergangsformen, z.B. adeno-villöse sowie auch Polypen mit beginnender carcinomatöser Entartung wurden nicht ausgewertet. Da ein rein villöser Polyp nur bei einem Tier gefunden wurde, konnte dieser Typ zur quantitativen Auswertung nicht herangezogen werden. Von den adenomatösen Polypen wurden nur die gestielten Polypen (sogen. Kirschpolypen) ausgewertet, da in den breitbasigen Formen nicht selten bereits maligne entartete Bezirke enthalten waren, sodaß hierbei die Gefahr der Verfälschung der Ergebnisse bestand.

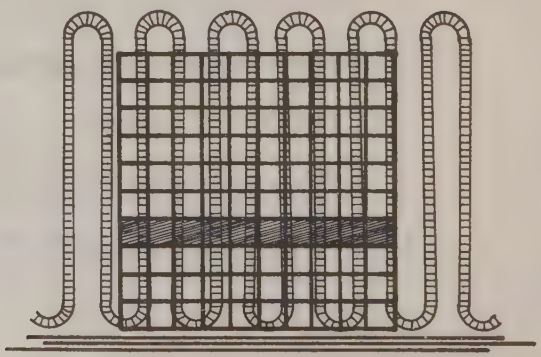
Weil sich typische gestielte Polypen bei Mäusen nur selten fanden, wurden zum Vergleich der quanti-

tativen Auswertungen nur Ratten herangezogen. Es wurden jeweils nur zentrale Längsschnitte durch den Polypen ausgewertet.

Zunächst wurde die Schleimhautdicke zwischen Muscularis mucosae und Schleimhautoberfläche mit dem Okularmikrometer gemessen. Dann wurde der ^{3}H-Index zonenweise zwischen Muscularis mucosae und Schleimhautoberfläche mit einem in 100 Teilquadrate aufgeteilten quadratischen Okularmeßfeld bestimmt : die Unterkante des Meßfeldes wurde genau auf die Muscularis mucosae eingestellt und für die einzelnen Zonen von der Breite des gesamten Meßfeldes und der Höhe eines Teilquadrates die Zahl der markierten und unmarkierten Zellen bei 450-facher Vergrößerung ausgezählt (s. Abb. 1).

Ausschnitt aus Darmschleimhaut mit aufgelegtem Okularmeßfeld

Abb. 1



Diese Methode ergab durch unterschiedliche Schleimhautdicke unterschiedliche Zonenzahlen für die Einzelmessungen, allerdings nie weniger als 5 Zonen. Um vergleichbare Aussagen zu erhalten, wurden alle Einzelwerte auf eine Zonenzahl von 5 umgerechnet, wie in einem Beispiel gezeigt wird (s. Abb. 2). Dadurch ergeben sich eventuell leichte Verschiebungen der Werte, aber keine wesentlichen Änderungen der Verhältnisse. Für jede einzelne Schleimhautveränderung wurden je nach ihrer Größe 5 bis 20 Messungen an verschiedenen Stellen durchgeführt. Die Zahl der Messungen für ein und dieselbe Schleimhautveränderung bzw. für ein und dasselbe Objekt war in allen Zonen gleich groß.

Die Summe der Einzelmessungen pro Zone und Objekt bildet eine Stichprobe. Die Prüfung mit dem H-Test (Sachs (18)) ergab, daß die Stichproben

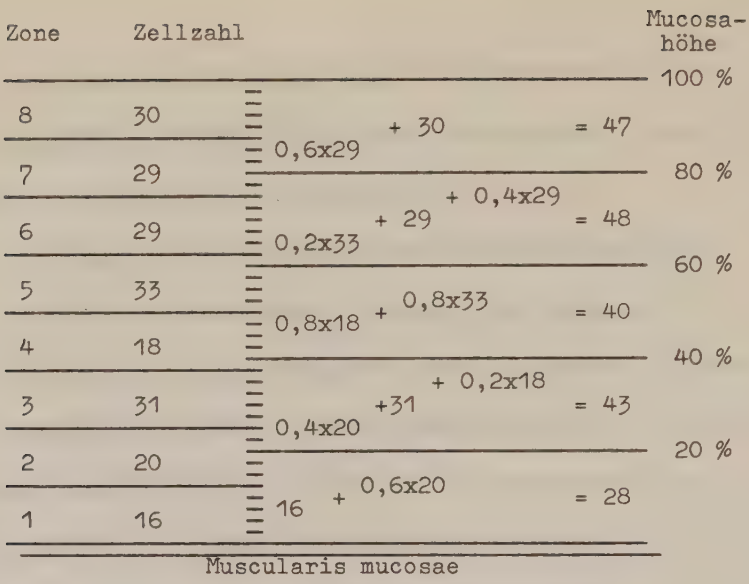


Abb. 2 Zahlenwerte unmarkierter Zellen
Beispiel einer Umrechnung in 5 Zonen

entsprechender Zonen aller Einzelveränderungen einer Gruppe als zugehörig zu einer homogenen Grundgesamtheit aufgefaßt werden können, sodaß alle Stichproben aller Veränderungen einer Gruppe nach Zonen zusammengefaßt werden konnten.
Auf Wahrscheinlichkeitspapier wurde zeichnerisch nachgewiesen, daß die Gesamtheit aller Einzelmessungen jeder Zone einer Gruppe nach STUDENT

verteilt war. Daraufhin wurde die Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Zonen mit dem t-Test berechnet; als Beispiel sei die Berechnung für die Zonen 2 und 4 der adenomatösen Polypen (s. Abb. 14) angeführt :

Für die 8 ausgewerteten Polypen wurden folgende Stichprobenmittelwerte gefunden (% markierte Zellen) :

Zone 2	Zone 4
22,7	31,6
17,3	20,1
25,0	33,0
13,0	25,5
26,5	42,2
20,4	28,7
30,1	35,9
19,7	19,8

Daraus ergaben sich die Mittelwerte :

21,8	29,6

t wurde nach der Formel

$$t = \frac{m_2 - m_4}{s} \times \sqrt{\frac{n_2 \times n_4}{n_2 + n_4}}$$

berechnet, dabei ist

$$s = \sqrt{\frac{S(x_2 - m_2)^2 + S(x_4 - m_4)^2}{n_2 + n_4 - 2}}$$

Die Summen der Abweichungsquadrate ergaben sich als

206,09 417,92

Damit ließ sich s berechnen :

$$s = \sqrt{\frac{206,09 + 417,92}{14}} = 6,67$$

Für t ergab sich dann :

$$t = \frac{21,8 - 29,6}{6,67} \times \sqrt{\frac{8 \times 8}{8 + 8}} = - 2,33$$

Aus Tabellen über die Signifikanzschranken der STUDENT-Verteilung ergab sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % für 14 Freiheitsgrade der Wert 2,1448. t = - 2,33 liegt außerhalb des Bereiches von - 2,1448 bis + 2,1448, d.h. der Unterschied der Mittelwerte der Zonen 2 und 4 ist signifikant.

Ebenso wurde die Signifikanz der Unterschiede zwischen einander entsprechenden Zonen ver-

schiedener Gruppen (z.B. Zone I der normalen Schleimhaut gegen Zone I der hyperplastischen Schleimhaut und Zone I des adenomatösen Polypen) berechnet.

Zu den quantitativen Auswertungen wurden als Kontrolle jeweils Colon ascendens und descendens von 3 Mäusen und 4 Ratten nach der oben beschriebenen Art ausgezählt. Aus dem oben angegebenen Kollektiv von 55 Mäusen und 68 Ratten wurden 3 Mäuse und 5 Ratten mit hyperplastischen Schleimhautveränderungen sowie 8 Polypen von 5 verschiedenen Ratten und 4 Polypen von Mäusen ausgezählt.

Weniger häufig gefundene Veränderungen typischer Art (z.B. ein typischer villöser Polyp im Rectum einer Maus) wurden ebenfalls ausgezählt, aber nicht zum quantitativen Vergleich herangezogen.

Ergebnisse

Die Tiere wurden zeitlich gestaffelt getötet, spätestens wenn die Allgemeinsymptome das Vor-

handensein von Darmtumoren vermuten ließen. Dann fanden sich häufig alle Stadien der Schleimhautveränderungen nebeneinander.

Die Tumorinduktionszeit und die zur Tumorerzeugung nötige Gesamtdosis zeigte zwischen Ratten und Mäusen keine wesentlichen Unterschiede, wenn die gleiche Behandlung vorgenommen wurde. Hyperplasien und kleinere adenomatöse Schleimhautherde fanden sich bei einzelnen Tieren schon nach dreimonatiger Behandlung mit einer wöchentlichen Dosis von 14 mg/kg Körpergewicht. Bei einer Gesamtdosis von 400 mg/kg und einer Induktionszeit von 200 Tagen waren regelmäßig Tumoren zu erwarten (s. Abb. 3). Die Induktionszeit sank deutlich mit steigender wöchentlicher Dosis, sie war bei 7 mg/kg/Woche am längsten, bei 21 mg/kg/Woche am kürzesten. Bei der wöchentlichen Dosis von 7 mg/kg Körpergewicht war die Tumorinduktionszeit so lang, daß zwar bei einzelnen Tieren Tumoren auftraten, die Mehrzahl aber vorher an inter-

Abb. 3 Polypen im Colon descendens einer Ratte.

kurrenten Erkrankungen verstarb.

Die Lokalisation der Tumoren zeigte dagegen dosisabhängige und artspezifische Unterschiede (s. Tab. 1). Während bei den niedrigen Dosierungen die Dickdarmtumoren ganz im Vordergrund standen, fanden sich bei einer Dosierung von 21 mg/kg/ Woche fast gleich viel Dünndarm- wie Dickdarmtumoren. Die Carcinome waren meist auf den Darmtrakt beschränkt; bei der Dosierung von 21 mg/kg/Woche waren allerdings 5 Duodenum- bzw. Coloncarcinome ausgedehnt im Bauchraum ausgebreitet. Neben dem kontinuierlichen Tumorwachstum fanden sich mehrmals Metastasen in den mesenterialen Lymphknoten und in der Leber. 3 Ratten starben an spontaner Verblutung in den Bauchraum, infolge Gefäßarrosion durch ein Carcinom. 4 Ratten starben am Invaginationsileus (durch große gestielte polypöse Tumoren).

Bei 2 Mäusen und 2 Ratten fand sich kombiniert mit einem Adenocarcinom des Rectums ein verhor-

Tabelle 1 Tumorbefall der einzelnen Darmabschnitte in den verschiedenen Versuchsgruppen

Gruppe	Duodenum	Jejunum	Ileum	Colon asc.	Colon desc.	Gesamtzahl d. tumortragenden Tiere
Mäuse ~14 mg/kg/Woche	0	1	0	8	18	19
Ratten 14 mg/kg/Woche	4	2	0	9	9	10
Ratten 21 mg/kg/Woche	16	10	3	15	19	22

nendes Plattenepithelcarcinom des Anus. 6 Tiere entwickelten Tumoren außerhalb des Intestinaltraktes, in allen Fällen Plattenepithelcarcinome des äußeren Gehörganges; davon hatten 5 Ratten eine Dosis von 21 mg/kg/Woche und 1 Maus 14 mg/kg/Woche erhalten.

Die makroskopisch erkennbaren Veränderungen der Dickdarmschleimhaut zeigten bei Ratten und Mäusen Unterschiede : während die Ratten neben den Carcinomen oft kurzgestielte Polypen (s. Abb. 4) ausbildeten, fanden sich bei den Mäusen selten diese Veränderungen. Hier lagen meist flache breitbasige Veränderungen vor, die entweder polypöse Carcinome oder bereits maligne entartete Polypen darstellten (s. Abb. 5). Die Mäuse neigten auch häufiger als die Ratten zur Ausbildung flacher Polypenrasen. Darüberhinaus bestanden innerhalb einer Art auch individuelle Unterschiede, z.B. fanden sich im gesamten Dickdarm einer Ratte zahlreiche

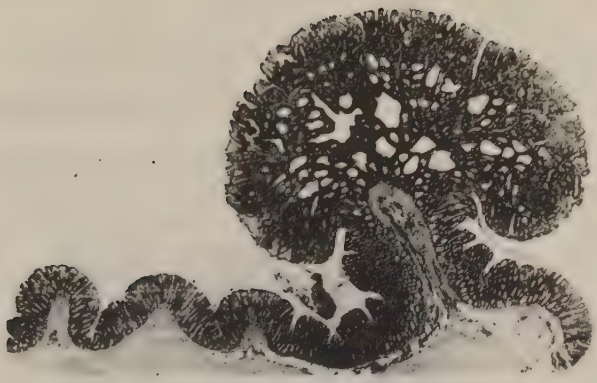


Abb. 4 Typischer gestielter adenomatöser Polyp mit überhängenden Rändern. Ratte, Colon descendens. HE. Vergr. ca 16fach.

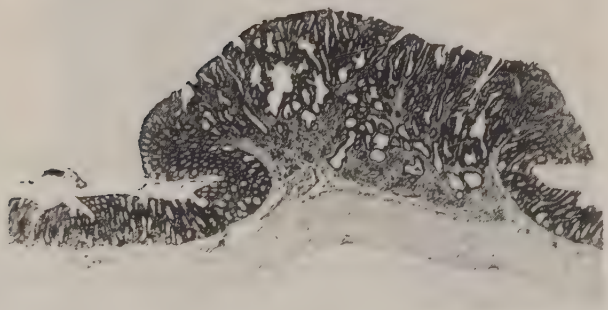


Abb. 5 Breitbasiger adenomatöser Polyp mit carcinomatöser Infiltration in die Submucosa. Maus, Colon descendens. HE. Vergr. 25fach.

gestielte Polypen, während andere Ratten bei gleicher Dosierung polypöse Tumorrasen, jedoch keine gestielten Polypen aufwiesen.
Verbreiterung und Verdickung der Schleimhautfalten finden sich oft in der Nachbarschaft von Carcinomen, aber auch isoliert.
Als früheste erkennbare Veränderungen während der Carcinogenese finden sich oft nur mikroskopisch nachweisbare Schleimhauthyperplasien. Sie liegen häufig auf den Kämmen der Schleimhautfalten. Gelegentlich sieht man als erste Veränderung eine mangelhafte Ausdifferenzierung der Zellen. Dabei können, wie Abb. 6 zeigt, die Becherzellen in weiten Schleimhautarealen stark vermindert sein.

In hyperplastischen Schleimhautbezirken fanden sich vor allem bei Mäusen, aber auch bei Ratten häufig keilförmige Schleimhautbezirke, die in der HE-Färbung vor allem durch die deutlich stärkere Basophilie der Zellen gegenüber der Umgebung auffielen, aber

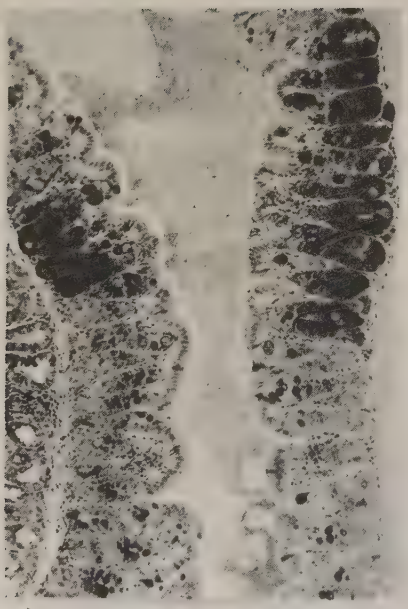


Abb. 6 Herde unregelmäßiger Verteilung der Becherzellen. Maus, Colon asc. Schleimfärbung. Vergr. ca. 120fach.

auch durch eine stärkere Schlängelung der Drüsenschläuche, und in der Schleimfärbung durch eine deutliche Verminderung der Zahl der Becherzellen.

Autoradiographisch zeigten diese Herde eine Änderung in der Verteilung des Markierungsindex : der Markierungsindex war oberflächennah größer, in den unteren Schleimhautschichten normal oder sogar vermindert (s. Abb. 7 u. 8).

In fortgeschrittenen Stadien breitete sich der veränderte Schleimhautbezirk fächerförmig nach den Seiten aus, während die Basis sich kaum verbreiterte. Von diesen flachen Schleimhautherden waren alle Übergänge zum gestielten Polypen mit seitlich überhängenden Rändern zu finden; dabei entwickelte sich mehr und mehr das Bild des adenomatösen Polypen : das undifferenzierte basophile Drüsenepithel wurde mehrreihig, die Drüsenschläuche wurden erweitert und ausgebuchtet. Das Oberflächenepithel war nicht mehr voll ausdifferenziert,

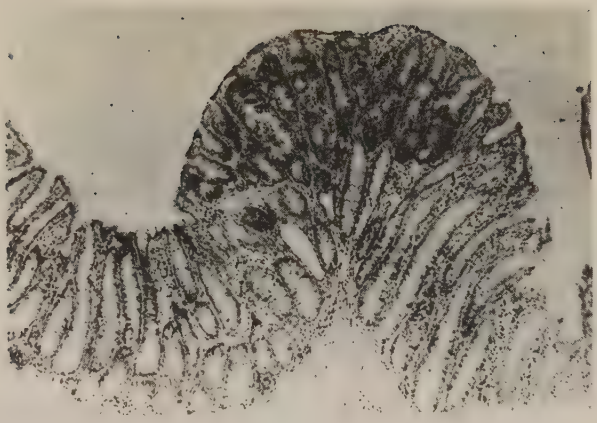


Abb. 7 Beginnende adenomatöse Veränderung. Maus, Colon desc. Autoradiogramm. Vergr. ca. 60fach.

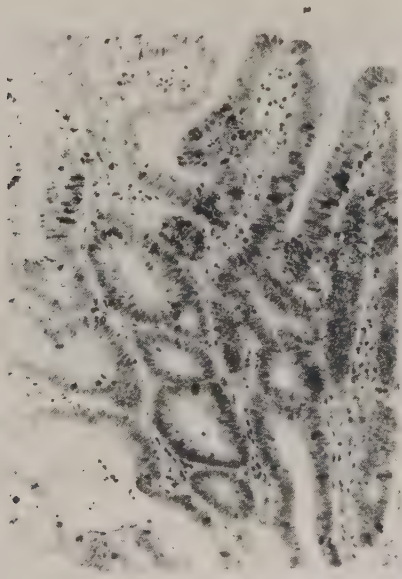


Abb. 8 Ausschnitt aus einem adenomatösen Polypen mit deutlich sichtbarem Maximum der ^{3}H-Markierung unter der Oberfläche. Autoradiogramm. Ratte. Vergr. ca. 240fach.

daher fanden sich über solchen Veränderungen häufig Erosionen.

Villöse Polypen fanden sich bei den Versuchstieren selten. Einige Polypen waren gemischt mit villösen Bezirken; ein rein villöser Polyp fand sich nur in einem Fall, im Rectum einer Maus (s. Abb. 9). Auch hier ist, wie bei den adenomatösen Polypen, die Markierung oberflächennah am stärksten. Ebenso fanden sich Erosionen an der Schleimhautoberfläche wegen der mangelnden Ausdifferenzierung des Oberflächenepithels.

Viele typische Polypen zeigten schon eine beginnende carcinomatöse Entartung. Es fanden sich allerdings auch häufig kleine undifferenzierte, deutlich stärker basophile Epithelbezirke in Schleimhautniveau, die schon ein infiltrierendes Wachstum zeigten : sogenannte "de novo"-Carcinome (s. Abb. 10).

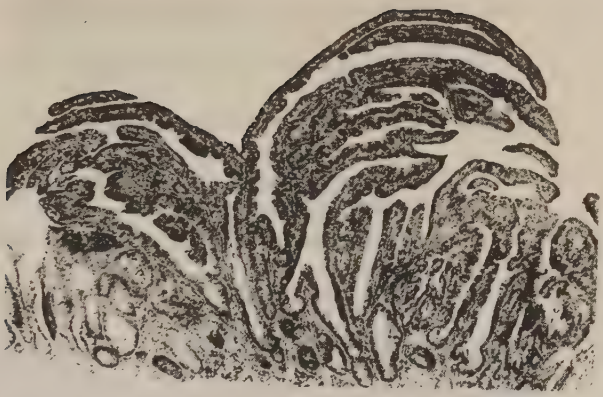


Abb. 9 Villöser Polyp. Maus, Rectum. HE. Vergr. ca. 60fach.

Abb. 10 Sogenanntes "de novo"-Carcinom. Ratte. Autoradiogramm. Vergr. ca. 60fach.

Die beobachteten Carcinome waren in der Mehrzahl Adeno-Carcinome, die manchmal Bezirke mit monozellulärer Verschleimung enthielten oder auch herdförmig das Bild des typischen Gallertcarcinoms boten (s. Abb. 11). In einzelnen Fällen fanden sich auch völlig undifferenzierte Carcinombezirke. In einigen Carcinomen des Rectums und in mehreren Polypen wurden auch herdförmig Paneth-Zellen gefunden.

Quantitative Bestimmungen :

Die Höhenmessung der Schleimhaut ergab bei den Hyperplasien im Colon ascendens eine durchschnittlich nur geringe Verbreiterung der Schleimhaut, im Colon descendens eine Verbreiterung bis auf das Doppelte der Normalhöhe, im Durchschnitt auf das Anderthalbfache. Als Beispiel seien die gefundenen Werte für die Hyperplasien angeführt :
Der Mittelwert für die Schleimhautdicke der

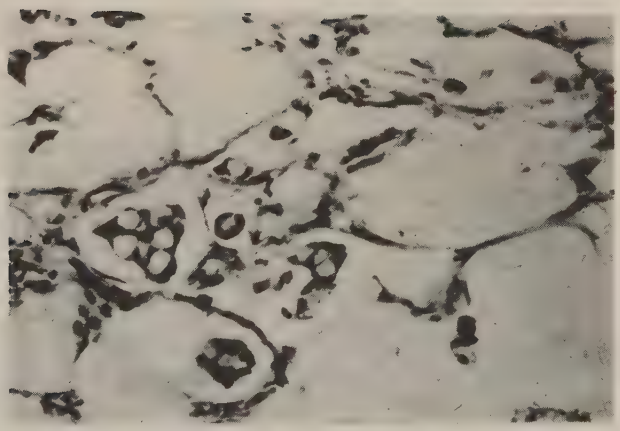


Abb. 11 Ausschnitt aus einem Adeno-Carcinom mit Ausbildung typischer sogen. Siegelringzellen. Ratte, Colon asc. HE. Vergr. ca. 400fach.

Kontrollratten betrug im Colon ascendens 192 µ, im Colon descendens 272 µ. Wegen dieses deutlichen Höhenunterschiedes wurden die Hyperplasien des Colon ascendens und descendens jeweils getrennt ausgewertet. Bei 3 Ratten mit einer diffusen Hyperplasie im Colon descendens ergaben sich folgende Stichprobenmittelwerte : 368 µ, 376 µ und 432 µ; der Mittelwert für die Höhe der ausgewerteten Schleimhauthyperplasien betrug 392 µ.

Bei der Höhenmessung der Schleimhaut der Polypen fand sich kein verwertbares Ergebnis, da große und kleine Polypen eine außerordentlich unterschiedliche Schleimhauthöhe zeigten, daher sind Durchschnittswerte ohne praktische Bedeutung. Maximal ergaben sich Zunahmen bis auf etwa das 8fache der Normalhöhe, durchschnittlich auf etwa das 4fache der Norm.

Die Ermittlung des ^{3}H-Index bezogen auf die

einzelnen Schleimhautzonen der Kontrolltiere (4 Ratten und 3 Mäuse) ergab für Colon ascendens und Colon descendens deutliche Unterschiede in der Verteilung der Markierung (s. Abb. 12 a, b, 13). Während im Colon ascendens das Maximum des ^{3}H-Index in der 2. und 3. Zone (von der Muscularis mucosae aus gerechnet) lag und gegenüber der 1. und 4. Zone signifikant war, lag es im Colon descendens in der 1. und 2. Zone, ebenfalls signifikant gegenüber der 3. Zone. Diese Unterschiede fanden sich in gleichem Maß bei Ratten und Mäusen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Verteilung des ^{3}H-Index im normalen Colon wurden auch Hyperplasien und Polypen jeweils nach Colon ascendens und descendens getrennt zusammengefaßt und ausgewertet.

Die gesamte Regenerationszone (d.h. die Zone von der Muscularis mucosae bis zur Höhe der höchstgelegenen sich teilenden Zelle) des

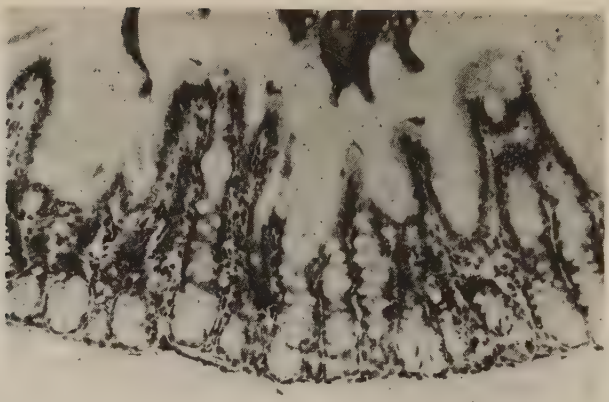


Abb. 12 a

Abb. 12 b

Abb. 12 a, b Autoradiogramme des normalen Colon ascendens (a) und descendens (b) einer Ratte, die deutlich die unterschiedliche Verteilung der Markierung innerhalb der Regenerationszone erkennen lassen. Vergr. ca. 160fach.

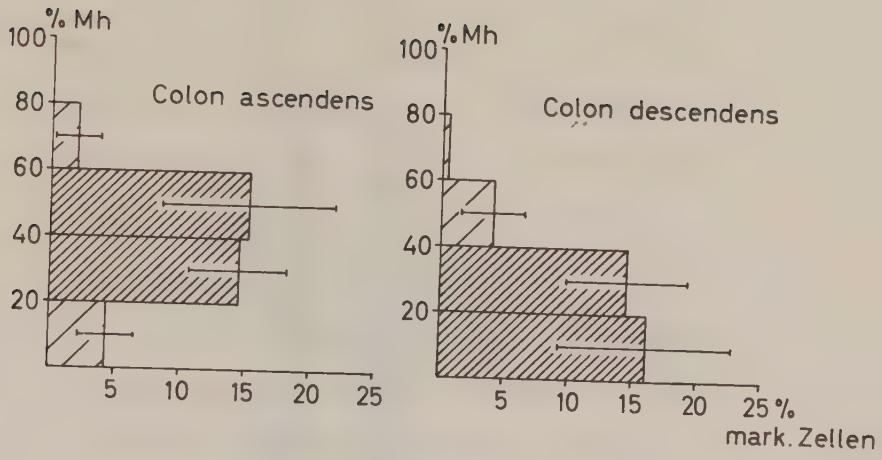


Abb. 13 Schema der Markierungs-Indices im Colon ascendens und descendens der Ratte. Die durch verschiedene Schraffierung gekennzeichneten Maxima und Minima sind statistisch signifikant voneinander unterschieden ($p < 0,01$).

normalen Colon descendens erreicht eine Höhe von ca. 60 % der gesamten Schleimhauthöhe, das entspricht den unteren 2/3 der Dickdarmkrypte (s. Abb. 14).

Bei der hyperplastischen Schleimhaut ist die Proliferationszone absolut höher als die der normalen Schleimhaut, relativ zur Schleimhautdicke jedoch nicht wesentlich verbreitert. Das Maximum des ^{3}H-Index liegt im Colon ascendens wie bei den Kontrollen zwischen 20 und 60 % der Schleimhauthöhe, im Colon descendens zwischen 0 und 40 % der Schleimhauthöhe. Die Zahl der markierten Zellen zwischen 60 und 80 % der Schleimhauthöhe ist jedoch erhöht, die Proliferationszone also relativ gering verbreitert. Der Absolutwert des ^{3}H-Index ist in allen Schichten gegen den Normalwert erhöht. Die geringe Verbreiterung der Proliferationszone ist statistisch nicht signifikant.

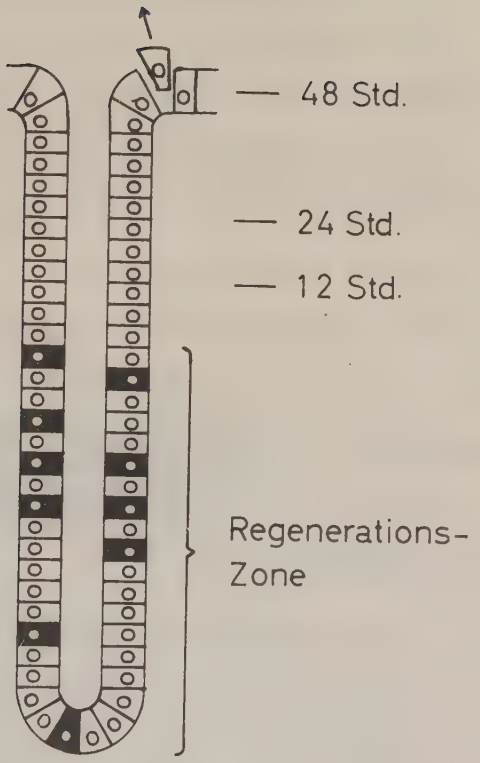


Abb. 14 Schema einer Dickdarmkrypte mit Angabe der Höhe der Regenerationszone und der ungefähren Wanderungsstrecke der Zellen innerhalb 12, 24 und 48 Stunden.

Bei den adenomatösen Polypen ist der ^{3}H-Index in den basalen zwei Zonen gegenüber der Hyperplasie nicht verändert, sie stellt allerdings hier kein Maximum, sondern ein Minimum dar, das Maximum des ^{3}H-Index liegt zwischen 60 und 80 % der Schleimhauthöhe, wo bei der Hyperplasie das Minimum liegt, d.h. die Verhältnisse sind in etwa umgekehrt (s. Abb. 15).
Absolut ist der ^{3}H-Index gegenüber dem Maximum der hyperplastischen Schleimhaut weiter gestiegen. Diese Veränderung ist der Norm gegenüber statistisch signifikant (für Zone 3 und 4 $p < 0{,}001$).

Zu den quantitativen Untersuchungen wurden ausschließlich adenomatöse gestielte Polypen verwendet. Bei der Auswertung einiger flacher adenomatöser Veränderungen fanden sich Abweichungen von dem hier aufgezeigten Verteilungsmuster des ^{3}H-Index, für die sich nach Durchmusterung von Serienschnitten die Erklärung in carcino-

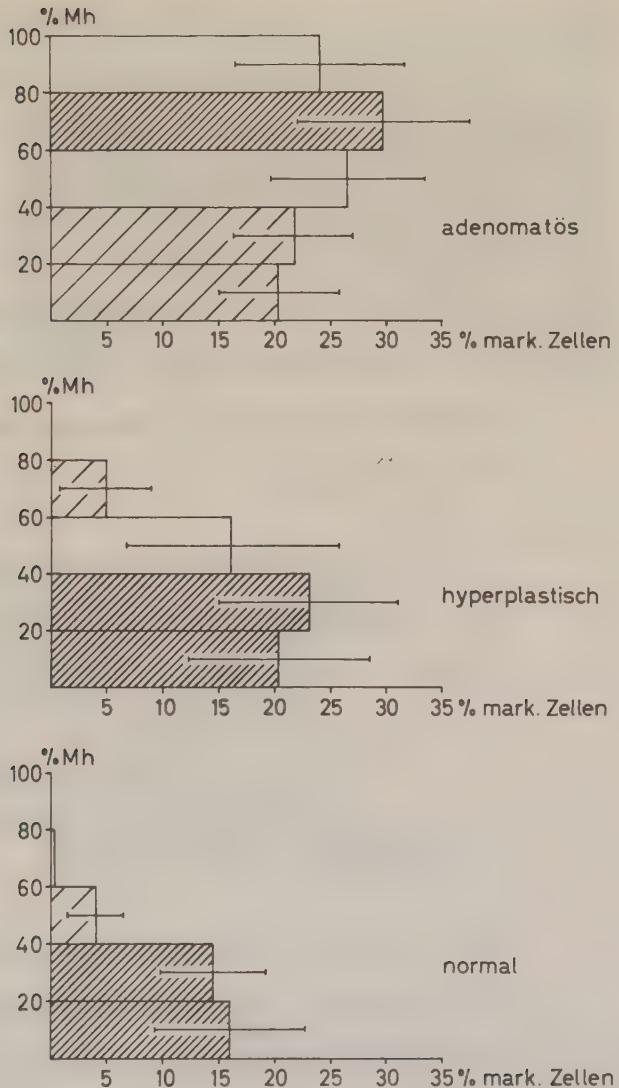


Abb. 15 Schema der unterschiedlichen Verteilung des Markierungsindex mit Angabe der Standardabweichung. Die Unterschiede zwischen den dich schraffierten Zonen (Maxima) und den locker schraffierten Zonen (Minima) sind statistisc signifikant ($p < 0{,}05$). Mh= Mucosahöhe.

matöser Entartung mit beginnender Infiltration in die Submucosa fand. In einem ausgewerteten Beispiel findet sich neben dem oberflächennahen Maximum des ^{3}H-Index ein weiteres Maximum nahe der Basis (s. Abb. 16 a, b), d.h. im Bereich des infiltrativen Wachstums. Absolut übersteigt hierbei der ^{3}H-Index jedoch nicht die Werte beim typischen gestielten Polypen.

Der typische villöse Polyp aus dem Rectum einer Maus zeigte in der Verteilung des ^{3}H-Index keine wesentlichen Unterschiede zu den adenomatösen Polypen.

Diskussion der Ergebnisse

Die erhebliche Diskrepanz zwischen dem großen Kollektiv der zum Versuch verwendeten Tiere und der geringen Anzahl schließlich zur Auswertung herangezogener Tiere hat

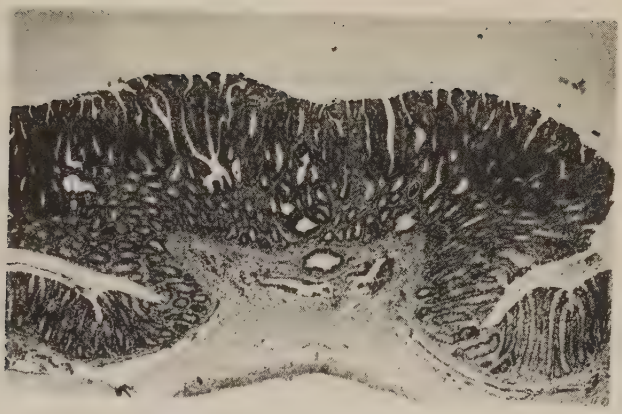


Abb. 16 a

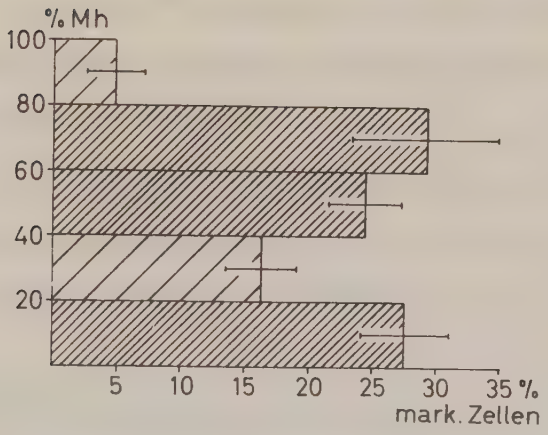


Abb. 16 b

Abb. 16 a, b Breitbasiger adenomatöser Polyp mit carcinomatöser Entartung (a). Schema der Verteilung des ^{3}H-Index (b). Das zweite Maximum in Zone 1 ist statistisch signifikant gegenüber dem Minimum in Zone 2 ($p < 0{,}001$).
16 a: HE, Vergr. 25fach.

mehrere Gründe. Einmal war ein großer Teil der gefundenen Veränderungen Mischformen, und bei der Anlegung strenger Maßstäbe fand sich nur ein verhältnismäßig geringer Anteil an typischen hyperplastischen oder adenomatösen Veränderungen. Weiterhin zeigten zahlreiche der gefundenen Veränderungen, bedingt durch die relativ hohe Dosierung des Carcinogens (da ja eine sichere Erzeugung von Tumoren beabsichtigt war), schon eine carcinomatöse Entartung. Außer Hyperplasien und Polypen fanden sich auch einzelne sogenannte "de novo"-Carcinome, die aus unverändert erscheinender Schleimhaut entstanden waren.

Die untersuchten Tiere zeigten als häufigste Tumorart Polypen und Adenocarcinome des Dickdarms. Besonders bei Ratten mit höherer Carcinogen-Dosierung traten auch Dünndarmtumoren (meist im Duodenum) und einzelne Plattenepithelcarcinome des äußeren Gehör-

ganges auf.

Eine Dosierung von 21 mg/kg/Woche war bei den Mäusen wegen der niedrigeren LD_{50} nicht möglich. Die mittlere letale Dosis (LD_{50}) nach subcutaner Injektion von DMH beträgt bei Mäusen etwa 42 mg/kg Körpergewicht (Löhrs et al. (14)), bei den Ratten dagegen 215 mg/kg Körpergewicht (Druckrey et al. (8)).

Die Mäuse zeigten eine deutliche Bevorzugung des Tumorbefalls im Colon descendens und Rectum im Gegensatz zu den Ratten, die etwa gleich viele Tumoren im Colon ascendens und descendens entwickelten.

Die Tatsache, daß sich mit der Erhöhung der Carcinogendosis die Häufigkeitsverteilung der epithelialen Tumoren in den einzelnen Darmabschnitten ändert, führt zu dem Schluß, daß offenbar eine unterschiedliche "Empfindlichkeit" der verschiedenen Darmabschnitte gegenüber dem Carcinogen besteht. Das aus

der menschlichen Pathologie geläufige Faktum, daß Dünndarmcarcinome selten sind, findet auch im vorliegenden Experiment eine Parallele. Erst bei höherer Carcinogendosierung - also bei Überschreiten der offenbar höheren Schwelle - entstehen Carcinome im Dünndarm. Aber auch in den einzelnen Dünndarmabschnitten ist die Empfindlichkeit gegenüber dem Carcinogen sehr unterschiedlich. Die Carcinomfrequenz nimmt vom Duodenum zum Ileum stark ab. Auch hierin bestätigt sich eine Beobachtung aus der Humanpathologie, daß die an und für sich seltenen Dünndarmcarcinome weitaus am häufigsten im Duodenum vorkommen.

Aus den vorliegenden quantitativen Untersuchungsergebnissen können folgende Schlüsse gezogen werden :

Die Hyperplasie ist gekennzeichnet durch die Steigerung der Zellproliferation an normaler Stelle bei normaler Ausdifferen-

zierung und Lebensdauer der Zellen.

Der adenomatöse Polyp (und auch der villöse) zeigt eine Verschiebung des Maximums der Epithelproliferation in die oberflächennahen Schichten.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Markierung DNS-synthetisierender Zellen mit ^{3}H-Thymidin als Maß für die Zellproliferation angesehen. Dies kann jedoch nur unter folgenden Voraussetzungen geschehen :

1. Thymidin und auch ^{3}H-Thymidin werden selektiv nur in DNS und keine anderen Zellbestandteile eingebaut (McQuade et al. (16)).
2. Die DNS-Synthese findet nur in der S-Phase statt (Steel, Lamerton (22)).
3. Die Dauer der DNS-Synthesephase ist konstant sowohl in den verschiedenen Zonen der Schleimhaut eines Individuums

als auch in verschiedenen Individuen einer Art (Koburg, Maurer (15), Pilgrim, Maurer (17)).

Da nach Löhrs u. Mitarb. (14) eine zumindest vorübergehende Verlängerung der DNS-Synthesephase unter dem akuten Einfluß von DMH möglich ist, ist der Einwand nicht zu widerlegen, daß die gefundene Steigerung des ^{3}H-Index möglicherweise durch eine solche Verlängerung der S-Phase hervorgerufen ist.

Das Wachstum und die fächerförmige Ausbreitung der Polypen weisen allerdings darauf hin, daß die Zellproliferation in den oberflächennahen Schleimhautschichten tatsächlich vermehrt ist, sodaß die Steigerung des ^{3}H-Index an dieser Stelle eben nicht als Ausdruck einer S-Phasenverlängerung, sondern im wesentlichen als Zeichen einer echten Proliferationssteigerung zu werten ist. Die eigenen Untersuchungen bestätigen die

Beobachtungen von Cole u. McKalen (4), die bei menschlichen Dickdarmpolypen eine Transposition der Proliferationszone von den basisnahen in die oberflächennahen Schleimhautschichten fanden.

Die eigenen Ergebnisse aus quantitativen Untersuchungen zeigen eine Verlagerung des Proliferationsmaximums in die oberflächennahe Schleimhautschicht. Die Zellproliferation in der Kryptentiefe ist dabei gegenüber den Kontrollen nicht vermindert, jedoch auch nur leicht erhöht.

Typische gestielte Polypen fanden sich überwiegend bei den Ratten, bei den Mäusen nur selten; dagegen entwickelten die Mäuse häufiger breitbasige adenomatöse Polypen und flache Polypenrasen.

Es wurden alle Übergänge vom Polypen zum Carcinom gefunden : gutartige gestielte Polypen, kurzgestielte Polypen mit carcino-

matöser Entartung, breitbasige Polypen mit carcinomatöser Entartung, und einzelne kaum über die Schleimhaut erhabene Mikro-Carcinome, die sogenannten "de novo"-Carcinome.

Die tierexperimentellen Ergebnisse erlauben durch das gleichzeitige Auftreten aller dieser Veränderungen die Aussage, daß die Entwicklung des Carcinoms im Dickdarm zwar über den Polypen ablaufen kann, aber nicht notwendig an vorausgehende polypöse Veränderungen gebunden ist. Häufig fanden sich allerdings auch weiter fortgeschrittene Carcinome, bei denen über die Art der Entstehung keine Aussage mehr gemacht werden konnte.

Die hier gefundene Häufigkeit an Carcinomen und maligne entarteten Polypen ist wohl bedingt durch die starke zeitliche Raffung der Carcinogenese, infolge der relativ

hohen Dosierung des Carcinogens. Hieraus darf jedoch nicht geschlossen werden, daß generell jeder Polyp zum Carcinom führen muß. Zwar kann der adenomatöse Polyp als eine Zwischenstufe in der Carcinomentwicklung angesehen werden, doch ist im Einzelfall durchaus nicht sicher, ob die Entwicklung auf das Carcinom hin fortschreitet. Die Rückbildungsfähigkeit adenomatöser Polypen des Menschen (Cole et al. (5)) zeigt, daß die Polypen nicht generell als irreversibel angesehen werden können.

Zusammenfassung

Bei Ratten und Mäusen wurden durch subcutane Injektionen von Dimethylhydrazin Carcinome und Carcinomvorstufen im Darm erzeugt. Schleimhauthyperplasien sowie adenomatöse und villöse Polypen wurden mit autoradiographischen Methoden auf ihre Veränderungen

der Proliferationskinetik hin untersucht. Es zeigte sich, daß der Hyperplasie eine Steigerung der Proliferation an normaler Stelle entspricht, während bei den Polypen das Proliferationsverteilungsmuster auch qualitativ verändert ist : das Maximum der Zellproliferation ist hier in die oberflächennahen Schleimhautschichten verschoben, während in den basalen Schleimhautschichten die (absolut ungefähr gleich gebliebene) Proliferationsrate jetzt ein Minimum darstellt.

Die Carcinogenese kann den Weg über Hyperplasie und Polyp nehmen, das vereinzelte Auftreten sogenannter "de novo"-Carcinome zeigt aber, daß sie nicht notwendig an vorbestehende polypöse Veränderungen gebunden ist.

Literaturverzeichnis

1) Brandts, A. Dissertation Köln 1970

2) Cavalli-Sforza, L. Biometrie
Stuttgart 1969

3) Cole, J.W., McKalen, A.
Observations of cell renewal in human rectal mucosa in vivo with thymidine-^{3}H.
Gastroenterology 41, 122-125, 1961

4) Cole, J.W., McKalen, A.
Studies on the morphogenesis of adenomatous polyps in the human colon
Cancer 16, 998-1002, 1963

5) Cole, J.W., McKalen, A., Powell, J.
The role of ileal contents in the spontaneous regression of rectal adenomas
Dis. Colon Rect. 4, 413-418, 1961

6) Deschner, E., Lewis, C.M., Lipkin, M.
In vitro studies of human rectal epithelial cells. I. Atypical zone of ^{3}H-thymidine incorporation in mucosa of multiple polyposis
J. Clin. Invest. 42, 1922-1928, 1963

7) Druckrey, H., Preußmann, R., Matzkies, F., Ivankovic, S.
Carcinogene Wirkung von 1,2-Diäthylhydrazin an Ratten
Naturwiss. 53, 557-558, 1966

8) Druckrey, H., Preußmann, R., Matzkies, F., Ivankovic, S.
Selektive Erzeugung von Darmkrebs bei Ratten durch 1,2-Dimethylhydrazin
Naturwiss. 54, 285-286, 1967

9) Druckrey, H. Persönliche Mitteilung

10) Dukes, C.E.
An explanation of the difference between a papilloma and an adenoma of the rectum
Proc. Roy. Soc. Med. 40, 829-830, 1947

11) Laqueur, G.L.
Carcinogenic effects of cycad meal and cycasin, methylazoxymethanol glycoside, in rats and effects of cycasin in germfree rats
Fed. Proc. 23, 1386-1387, 1964

12) Laqueur, G.L.
The induction of intestinal neoplasms in rats with the glycoside cycasin and its aglycone
Virch. Arch. Path. Anat. 340, 151-163, 1965

13) Laqueur, G.L., Mickelson, O., Whiting, M.G., Kurland, L.T.
Carcinogenic properties of nuts from Cycas circinalis L. indigenous to Guam
J. Nat. Cancer Inst. 31, 919-951, 1963

14) Löhrs, U., Wiebecke, B., Eder, M.
Morphologische und autoradiographische Untersuchung der Darmschleimhautveränderungen nach einmaliger Injektion von 1,2-Dimethylhydrazin
Z. ges. Exp. Med. 151, 297-307, 1969

15) Koburg, E., Maurer, W.
Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin über die Dauer der DNS-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus
Biochem. Biophys. Acta 61, 229-242, 1962

16) McQuade, H.A., Friedkin, M., Atchison, A.A.
Radiation effects of thymidine-2-C^{14}.
I. Uptake of thymidine-2-C^{14} and thymine-2-C^{14} in the onion root tip
Exp. Cell Res. 11, 249-256, 1956

17) Pilgrim, C.H., Maurer, W.
Autoradiographische Untersuchungen über die Konstanz der DNS-Verdoppelungs-Dauer bei Zellarten von Maus und Ratte durch Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin
Exp. Cell Res. 37, 183-199, 1965

18) Sachs, L.
Statistische Auswertungsmethoden
Berlin 1968

19) Schoental, R., Bensted, J.P.M.
Tumours of the intestines induced in rats by intraperitoneal injections of N-methyl- and N-ethyl-N-nitrosouretanes
Brit. J. Cancer 22, 316-323, 1968

20) Schultze, B.
Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm
in : Hdb. d. Allg. Path. Bd. II/5, 466-670, Berlin 1968

21) Spjut, H.J., Spratt, J.S.
Endemic and morphologic similarities existing between spontaneous colonic neoplasms in man and 3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced colonic neoplasms in rats
Ann. Surg. 161, 309-324, 1965

22) Steel, G.G., Lamerton, L.F.
The turnover of tritium from thymidine in tissues of the rat
Exp. Cell Res. 37, 117-131, 1965

23) Wiebecke, B., Löhrs, U., Gimmy, J., Eder, M.
Erzeugung von Darmtumoren bei Mäusen durch 1,2-Dimethylhydrazin
Z. ges. Exp. Med. 149, 277-278, 1969

24) Wissenschaftliche Tabellen
Basel 1968

Lebenslauf

Am 24. Juli 1942 wurde ich als erstes Kind des Dr.med. Wilhelm Werner und seiner Ehefrau Dr.med. Marta geb. Hamm in Göttingen geboren. Von Ostern 1949 bis Ostern 1953 besuchte ich die Volksschule in Seesen am Harz, dann wechselte ich an das Gymnasium Seesen über. Im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig dieses Gymnasiums bestand ich am 23. Februar 1962 das Abitur. Im Sommersemester 1962 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Würzburg. Dort bestand ich am Ende des Wintersemesters 1962/63 die naturwissenschaftliche Vorprüfung. Im Sommersemester 1964 wechselte ich an die Universität Köln über; am Ende des Sommersemesters 1964 bestand ich die ärztliche Vorprüfung in Köln. Die gesamte klinische Studienzeit verbrachte ich in Köln. Am 19. Juli 1967 heiratete ich den Ingenieur Peter Krey aus Köln. Das medizinische Staatsexamen bestand ich am 14. Dezember 1967. Vom 1. April bis 31. Oktober 1968 war ich als Medizinalassistentin am Pathologischen Institut der Universität Köln tätig (damaliger Direktor : Prof. Dr.med. M. Eder). Vom 1. November 1968 bis 30. April 1969 arbeitete ich in der

Chirurgischen Abteilung des Dreikönigen-Hospitals in Köln-Mülheim (Chefarzt: Dr.med. N. Tietz) als Medizinalassistentin. Vom 1. Mai bis 30. Juni 1969 arbeitete ich wieder im Pathologischen Institut der Universität Köln; in dieser Zeit begann ich mit der Arbeit an meiner Dissertation. Vom 1. Juli bis 31. Oktober 1969 absolvierte ich die Pflichtzeit an der Universitäts-Frauenklinik Köln (damaliger Direktor: Prof. Dr.med. C. Kaufmann), vom 1. November 1969 bis 28. Februar 1970 die Pflichtzeit an der Medizinischen Universitäts-klinik Köln (Direktor: Prof. Dr.med. R. Gross).

Am 2. März 1970 wurde mir die Bestallung als Arzt erteilt. Seit dem 1. September 1970 arbeite ich im Deutschen Institut für medizinische Dokumentation und Information in Köln.